

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 5 月 30 日 (30.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/044188 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/00, 5/10,
A61K 48/00, 31/713, G01N 33/50, 33/15

(SAIGO,Kaoru) [JP/JP]; 〒168-0063 東京都杉並区和泉 4-3 1-7 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/12183

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI,Shohei et al.): 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目 1 2 番 3 2 号 アーク森ビル 2 8 階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2002 年 11 月 21 日 (21.11.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2001-355896
2001 年 11 月 21 日 (21.11.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内二丁目 5 番 2 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 程 久美子 (TEI,Kumiko) [JP/JP]; 〒113-0032 東京都文京区弥生 1-5-1 第 2 東亜マンション 503 号 Tokyo (JP). 梶 隆英 (KAJI,Takahide) [JP/JP]; 〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地 三菱化学株式会社内 Kanagawa (JP). 上田 龍 (UEDA,Ryu) [JP/JP]; 〒194-8511 東京都町田市南大谷 1 1 号 株式会社三菱化学生命科学研究内 Tokyo (JP). 西郷 薫

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF INHIBITING GENE EXPRESSION

(54) 発明の名称: 遺伝子発現阻害方法

(57) Abstract: A method of inhibiting the expression of a target gene which comprises transferring a double-stranded polynucleotide consisting of a DNA having a sequence substantially identical with at least a part of the base sequence of the target gene and RNA into a cell, a tissue or an individual.

(57) 要約:

本発明は、標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドを、細胞、組織、あるいは個体に導入することによる標的遺伝子の発現阻害方法に関する。

WO 03/044188 A1

明 細 書

遺伝子発現阻害方法

技術分野

本発明は、標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドを、細胞、組織、あるいは個体に導入することによる標的遺伝子の発現阻害方法に関する。

背景技術

細胞、組織、あるいは個体内の標的遺伝子の発現阻害方法のひとつとして 2 本鎖 RNA を該細胞、組織、あるいは個体内に導入することによりその配列に相同性を持つ mRNA の分解を促進し、結果的に mRNA の鋳型となる遺伝子の発現を阻害する（以下この効果を「RNAi 効果」と称することがある）方法（以下これを「RNAi 法」と称することがある）がある。この手法はこれまで植物(Waterhouse, P. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 13959-13964 (1998))、トリパノソーマ (Ngo, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 14687-14692(1998))、ヒドラ (Lohmann, J. U., et al., Dev. Biol. ,214, 211-214(1999))、プラナリア (Sanchez Alvarado, et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA., 96, 5049-5054 (1999))、線虫 (Fire, A., et al., Nature, 391, 806-811 (1998))、ショウジョウバエ (Kannerdell, J. R., et al., Cell, 95, 1017-1026 (1998) ; Misquitta, L., et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA., 96, 1451-1456(1999)) の個体で効果的であることが報告されている。

また、脊椎動物においてその効果は限定的であるとされていたが、3' 末端に 2 ベース突出したそれぞれ 19 ヌクレオチドからなる 2 本鎖 RNA を用いれば、脊椎動物の培養細胞において、RNAi 効果が見られることが報告されている (Elbashir, S., et al., Nature, 411, 494-498(2001))。後述する遺伝子機能の同定や、有用物質生産に適した細胞株等のスクリーニング方法において、RNAi 法を用いる優位性は明らかであるが、RNA は特に 1 本鎖の状態では RNA 分解酵素に

よって極めて容易に分解され、かつ製造費用が高額であるという問題点がある。従って、RNAi 法に用い得る安定性の高いポリヌクレオチドの開発が望まれていた。

発明の開示

本発明は、DNA を含むことにより安定性の高まった 2 本鎖ポリヌクレオチドを細胞、組織、あるいは個体に導入することにより、該ポリヌクレオチドが有する塩基配列と実質的に一部が同一の配列を有する標的遺伝子の発現を阻害する方法を提供すること等を課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意努力を重ねた結果、ハムスター培養細胞である CHO-K1 において、ルシフェラーゼ遺伝子の一部の塩基配列を有する DNA と RNA のハイブリッドである 2 本鎖ポリヌクレオチド、および DNA と RNA のキメラである 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入したところ、該細胞内においてルシフェラーゼ遺伝子の発現が阻害されることを見だし、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明によれば、下記 (1) ～ (24) に記載の発明が提供される。

(1) 標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドを、細胞、組織、あるいは個体に導入することを特徴とする標的遺伝子の発現阻害方法。

(2) 2 本鎖ポリヌクレオチドが、自己相補性を有する 1 本鎖からなることを特徴とする上記 (1) に記載の方法。

(3) 2 本鎖ポリヌクレオチドが、DNA 鎖と RNA 鎖のハイブリッドであることを特徴とする上記 (1) または (2) に記載の方法。

(4) DNA 鎖と RNA 鎖のハイブリッドが、センス鎖が DNA で、アンチセンス鎖が RNA であることを特徴とする上記 (3) に記載の方法。

(5) 2 本鎖ポリヌクレオチドが、DNA と RNA のキメラであることを特徴とする上記 (1) または (2) に記載の方法。

(6) 2 本鎖ポリヌクレオチドが、該ポリヌクレオチドのうち、少なくとも上流側の一部が RNA であることを特徴とする上記 (1) ～ (5) のいずれかに記載

の方法。

(7) 上流側の一部が、9～13ヌクレオチドからなることを特徴とする上記(6)に記載の方法。

(8) 2本鎖ポリヌクレオチドが、19～25ヌクレオチドからなり、該ポリヌクレオチドのうち、少なくとも上流1/2がRNAであることを特徴とする上記(1)～(6)のいずれかに記載の方法。

(9) 標的遺伝子が、複数であることを特徴とする上記(1)～(8)のいずれかに記載の方法。

(10) 上記(1)～(9)のいずれかに記載の方法による標的遺伝子の発現阻害の結果、該細胞、組織、あるいは個体に現れる表現型の変化を解析することを特徴とする遺伝子の機能解析方法。

(11) 上記(1)～(9)のいずれかに記載の方法を用いた標的遺伝子の発現の阻害により、細胞、組織、あるいは個体に特定の性質を付与する方法。

(12) 上記(11)に記載の方法により得られる細胞、組織、あるいは個体。

(13) 上記(12)に記載の細胞、組織、あるいは個体に被検物質を添加し、該細胞、組織、あるいは個体に付与された性質の変化を解析することを特徴とする、標的遺伝子が関与する疾病の予防、及び/または治療剤のスクリーニング方法。

(14) 上記(13)に記載の方法により得られた物質を有効成分とする標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び/または治療剤。

(15) 上記(13)に記載の方法により選抜された物質を製剤化することを特徴とする標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び/または治療剤の製造方法。

(16) 上記(1)～(9)のいずれかに記載の方法において、細胞、組織、あるいは個体にさらにインディケータータンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターを導入して、該インディケータータンパク質から発せられる信号量が、特定の強さ以上のものを選択して解析することを特徴とする方法。

(17) 上記(1)～(9)のいずれかに記載の方法において、細胞、組織、あるいは個体にさらにインディケータータンパク質をコードするDNAを含む発現ベクター、及び該DNAの少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列から

なり、かつ DNA を含む 2 本鎖 RNA を細胞に導入して、該インディケータータンパク質から発せられる信号量が減弱した細胞、組織、あるいは個体を選択して解析することを特徴とする方法。

(18) インディケータータンパク質が、タンパク質量とそれが発する信号量とが比例して変化していくものである上記 (16) または (17) に記載の方法。

(19) インディケータータンパク質が、ルシフェラーゼである上記 (16) ～ (18) のいずれかに記載の方法。

(20) (i) 標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する 2 本鎖ポリヌクレオチドであって DNA と RNA のキメラからなるものを作製し、(ii) 該 2 本鎖ポリヌクレオチドを細胞、組織、あるいは個体に導入し、(iii) 該細胞、組織、あるいは個体中の標的遺伝子の発現阻害度を測定し、(iv) 標的遺伝子の発現阻害に RNA であることが必要とされる配列を特定することを特徴とする RNAi 法における RNA の機能部位の同定方法。

(21) 2 本鎖ポリヌクレオチドが、その 2 本鎖のどちらか一方が RNA 鎖であることを特徴とする上記 (20) に記載の方法。

(22) 上記 (1) ～ (11)、(13)、(15) ～ (21) のいずれかに記載の方法に用いるための 2 本鎖ポリヌクレオチド。

(23) 少なくとも上記 (22) に記載の 2 本鎖ポリヌクレオチドを含む標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び／または治療剤。

(24) 少なくとも上記 (22) に記載の 2 本鎖ポリヌクレオチドを含む上記 (1) ～ (11)、(13)、(15) ～ (21) のいずれかに記載の方法を行うためのキット。

図面の簡単な説明

図 1 は、2 本鎖ポリヌクレオチドの作製に使われた 21 ヌクレオチドからなるセンス 1 本鎖ポリヌクレオチドならびに 21 ヌクレオチドからなるアンチセンス 1 本鎖ポリヌクレオチドの配列を示す図である。いずれも左が 5' 末端、右が 3' 末端を意味し、太字が RNA、下線が DNA からなることを示す。

図 2 は、CHO-KI 細胞に、DNA-RNA ハイブリッドの 2 本鎖ポリヌクレオチド

を導入した場合の luc 遺伝子発現の阻害を示す図である。

図 3 は、S 2 細胞に、センス鎖が RNA で、アンチセンス鎖が DNA-RNA キメラである 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入した場合の luc 遺伝子発現の阻害を示す図である。

図 4 は、HeLa 細胞、及び HEK293 細胞に、アンチセンス鎖が RNA で、センス鎖が DNA-RNA キメラである 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入した場合の luc 遺伝子発現の阻害を示す図である。

図 5 は、CHO-K1 細胞に、DNA-RNA キメラである 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入した場合の luc 遺伝子発現の阻害を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

(1) RNAi 法に用いるための DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチド

本発明は、標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドを、細胞、組織、あるいは個体に導入することを特徴とする標的遺伝子の発現阻害方法である。

本発明において、標的遺伝子とは、これを導入する細胞、組織、あるいは個体（以下これを「被導入体」と称することがある）に mRNA、及び任意にタンパク質を産出するように翻訳され得るものであれば如何なるものであってもよい。具体的には、導入する対象物の内在性のものでも、また外来性のものでもよい。また、染色体上に存在する遺伝子でも、染色体外のものでもよい。外来性のものとしては、例えば、被導入体に感染可能なウイルス、バクテリア、真菌または原生動物のような病原体由来のもの等が挙げられる。その機能については、既知のものでも、未知のものでもよく、また、他生物の細胞内では機能が既知であるが、被導入体内では機能が未知のもの等でもよい。

これらの遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一な配列を有する DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチド（以下、これを「2 本鎖ポリヌクレオチド」と称することがある）とは、標的遺伝子の塩基配列のうち、いずれの部分でもよい 20 ヌクレオチド以上の配列と実質的に同一な配列からなるもので

ある。ここで、実質的に同一とは、標的遺伝子の配列と50%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上の相同性を有することを意味する。ヌクレオチドの鎖長は19ヌクレオチドから標的遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)の全長までの如何なる長さでもよいが、19~500ヌクレオチドの鎖長を有するものが好ましく用いられる。ただし、哺乳類動物由来の細胞においては、30ヌクレオチド以上の鎖長を有する2本鎖RNAに反応して活性化するシグナル伝達系の存在が知られている。これはインターフェロン反応と呼ばれており(Mareus, P. I., et al., Interferon, 5, 115-180(1983))、該2本鎖RNAが細胞内に侵入すると、PKR(dsRNA-responsive protein kinase: Bass, B.L., Nature, 411, 428-429(2001))を介して多くの遺伝子の翻訳開始が非特異的に阻害され、それと同時に2', 5' oligoadenylate synthetase(Bass, B.L., Nature, 411, 428-429(2001))を介してRNaseLの活性化が起こり、細胞内のRNAの非特異的な分解が惹起される。これらの非特異的な反応のために、標的遺伝子の特異的な反応が隠蔽されてしまう。従って哺乳類動物、または該動物由来の細胞、あるいは組織を被導入体として用いる場合には19~25、好ましくは19~23、さらに好ましくは19~21ヌクレオチドからなる2本鎖ポリヌクレオチドが用いられる。本発明の2本鎖ポリヌクレオチドは、その全体が2本鎖である必要はなく、5'、または3'末端が一部突出したものも含み、その突出末端は1~5ヌクレオチド、好ましくは1~3ヌクレオチド、さらに好ましくは2ヌクレオチドである。また、最も好ましい例としては、各ポリヌクレオチド鎖の3'末端が2ヌクレオチドずつ突出している構造を有するものが挙げられる。2本鎖ポリヌクレオチドは、相補性を有する部分が2本鎖となっているポリヌクレオチドを意味するが、自己相補正を有する1本鎖ポリヌクレオチドが自己アニーリングしたものでもよい。自己相補正を有する1本鎖ポリヌクレオチドとしては、例えば、逆方向反復配列を有するもの等が挙げられる。

さらに、DNAとRNAの混合については、DNA鎖とRNA鎖のハイブリッド型や、DNAとRNAのキメラ型等が用いられる。DNA鎖とRNA鎖のハイブリッドは、それを被導入体に導入した際に、標的遺伝子の発現が阻害される活性を有するものである限り如何なるものであってもよいが、好ましくは、センス鎖がDNA

であり、アンチセンス鎖が RNA であるものが用いられる。また、DNA と RNA のキメラ型では、それを被導入体に導入した際に、標的遺伝子の発現が阻害される活性を有するものである限り如何なるものであってもよい。2 本鎖ポリヌクレオチドの安定性を高めるためには DNA をできるだけ多く含むことが好ましいが、本発明のキメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドのうち、RNA であることが標的遺伝子の発現阻害に必要な配列については、後述する標的遺伝子の発現阻害度の解析を行いながら発現阻害の起こる範囲で適宜決定していくことが望ましい。これにより、RNAi 法における RNA の機能部位を同定することもできる。かくして決定されたキメラ型の好ましい例としては、例えば、2 本鎖ポリヌクレオチドの上流側の一部が RNA であるものが挙げられる。ここで、上流側とは、センス鎖の 5' 側およびアンチセンス鎖の 3' 側を意味する。上流側の一部とは、上記 2 本鎖ポリヌクレオチドの上流の末端から 9 ～ 13 ヌクレオチドの部分が好ましく挙げられる。また、このようなキメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドとして好ましい例としては、ポリヌクレオチドの鎖長がそれぞれ 19 ～ 21 ポリヌクレオチドからなり、該ポリヌクレオチドのうち、少なくとも上流側 1 / 2 が RNA で、それ以外が DNA である 2 本鎖ポリヌクレオチドが挙げられる。また、このような 2 本鎖ポリヌクレオチドにおいて、アンチセンス鎖が全て RNA であると、標的伝子の発現阻害効果はさらに高い。

2 本鎖ポリヌクレオチドの調製方法としては、特に制限はないが、それ自体既知の化学合成方法を用いることが好ましい。化学合成は、相補性を有する 1 本鎖ポリヌクレオチドを別個に合成し、これを適当な方法で会合させることにより 2 本鎖とすることができる。会合の方法として具体的には、例えば、合成した 1 本鎖ポリヌクレオチドを好ましくは少なくとも約 3 : 7 のモル比で、より好ましくは約 4 : 6 のモル比で、そして最も好ましくは本質的に同モル量（すなわち約 5 : 5 のモル比）で混合し、2 本鎖が解離する温度にまで加熱し、その後徐々に冷却する方法等が挙げられる。会合した 2 本鎖ポリヌクレオチドは、必要に応じてそれ自体公知の通常用いられる方法により精製される。精製方法としては、例えばアガロースゲル等を用いて確認し、任意に残存する 1 本鎖ポリヌクレオチドを適当な酵素により分解する等して除去する方法を用いることができる。

また、自己相補正を有する 1 本鎖ポリヌクレオチドとして、逆方向反復配列を有するものを調製する場合には、該ポリヌクレオチドを化学合成等の方法で作製した後に上記と同様の方法で自己相補性を有する配列を会合させることにより調製する。

(2) 2 本鎖ポリヌクレオチドの細胞、組織、あるいは個体への導入、及び標的遺伝子の発現阻害

このようにして調製した 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入する被導入体としては、標的遺伝子はその細胞内で RNA に転写、またはタンパク質に翻訳され得るものであれば如何なるものであってもよい。具体的には、本発明で用いる被導入体は、細胞、組織、あるいは個体を意味する。

本発明に用いられる細胞としては、生殖系列細胞、体性細胞、分化全能細胞、多分化能細胞、分割細胞、非分割細胞、実質組織細胞、上皮細胞、不滅化細胞、または形質転換細胞等何れのものであってもよい。具体的には、例えば、幹細胞のような未分化細胞、器官または組織由来の細胞あるいはその分化細胞等が挙げられる。組織としては、単一細胞胚または構成性細胞、または多重細胞胚、胎児組織等を含む。また、上記分化細胞としては、例えば、脂肪細胞、繊維芽細胞、筋細胞、心筋細胞、内皮細胞、神経細胞、グリア、血液細胞、巨核球、リンパ球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、白血球、顆粒球、ケラチン生成細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞および内分泌腺または外分泌腺の細胞等が挙げられる。このような細胞の具体例としては、CHO-KI 細胞(RIKEN Cell bank)、ショウジョウバエ S 2 細胞 (Schneider, I., et al., J. Embryol. Exp. Morph., 27, 353-365(1972))、ヒト HeLa 細胞(ATCC:CCL-2)、あるいはヒト HEK293 細胞(ATCC:CRL-1573)等が好ましく用いられる。

さらに、本発明で被導入体となる個体として、具体的には、植物、動物、原生動物、ウイルス、バクテリア、または真菌種に属するもの等が挙げられる。植物は単子葉植物、双子葉植物または裸子植物であってよく、動物は、脊椎動物または無脊椎動物であってよい。本発明の被導入体として好ましい微生物は、農業で、または工業によって使用されるものであり、そして植物または動物に対して病原

性のものである。真菌には、カビ及び酵母形態両方での生物体が含まれる。脊椎動物の例には、魚類、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ハムスター、マウス、ラット、サル及びヒトを含む哺乳動物が含まれ、無脊椎動物には、線虫類及び他の虫類、キイロショウジョウバエ (*Drosophila*)、および他の昆虫が含まれる。

被導入体への２本鎖ポリヌクレオチドの導入法としては、被導入体が細胞、あるいは組織の場合は、カルシウムフォスフェート法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、ウィルス感染、２本鎖ポリヌクレオチド溶液への浸漬、あるいは形質転換法等が用いられる。また、胚に導入する方法としては、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション法、あるいはウィルス感染等が挙げられる。被導入体が植物の場合には、植物体の体腔または間質細胞等への注入または灌流、あるいは噴霧による方法が用いられる。また、動物個体の場合には、経口、局所、（皮下、筋肉内及び静脈内投与を含む）非経口、経膈、経直腸、経鼻、経眼、腹膜内投与等によって全身的に導入する方法、あるいはエレクトロポレーション法やウィルス感染等が用いられる。経口導入のための方法には、２本鎖ポリヌクレオチドを生物の食物と直接混合することができる。さらに、個体に導入する場合には、例えば埋め込み長期放出製剤等として投与することや、２本鎖ポリヌクレオチドを導入した導入体を摂取させることにより行うこともできる。

導入する２本鎖ポリヌクレオチドの量は、導入体や、標的遺伝子によって適宜選択することができるが、細胞あたり少なくとも１コピー導入されるに充分量に導入することが好ましい。具体的には、例えば、被導入体がヒト培養細胞で、カルシウムフォスフェート法により２本鎖ポリヌクレオチドを導入する場合、 $0.1 \sim 1000 \text{ nM}$ が好ましい。

ここで、２本鎖ポリヌクレオチドは、２種類以上のものを同時に導入することもできる。この場合、該ポリヌクレオチドの導入を受けた細胞、組織、あるいは個体（以下これを「導入体」と称することがある）においては、２種類以上の標的遺伝子の発現阻害が期待される。

本発明において、標的遺伝子の発現阻害とは、その発現を完全に阻害することだけでなく、*m*-RNA、もしくはタンパク質の発現量として２０％以上の阻害を意味する。標的遺伝子の発現阻害度は、標的遺伝子の RNA の蓄積、または標的遺

伝子によってコードされるタンパク質の産出量を、2本鎖ポリヌクレオチドの導入体と非導入体において比較することにより測定することができる。mRNA量は、それ自体既知の通常用いられる方法により測定することができる。具体的には、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、定量的リバーstransフェレースPCR、あるいは In situ hybridization 等を用いて行うことができる。また、タンパク質の産生量は、標的遺伝子がコードするタンパク質を抗原とする抗体によるウェスタンブロッティング法や、標的遺伝子がコードするタンパク質が有する酵素活性を測定すること等により測定することができる。

(3) 導入体内の遺伝子の発現阻害による遺伝子機能解析方法

本発明の2本鎖ポリヌクレオチドによる導入体内の遺伝子の発現阻害の結果、該導入体に現れる表現型の変化を解析することにより導入した2本鎖ポリヌクレオチドが標的とする遺伝子の機能を同定することができる。

ここで、標的遺伝子はその機能が既知であっても、被導入体内での機能が未知のものであってもよい。該標的遺伝子に対応する2本鎖ポリヌクレオチドは上記(1)に記載のとおり調製され、(2)に記載の被導入体に同様にして導入する。導入体でその変化を解析すべき表現型は特に制限はされないが、例えば導入体の形態、導入体内物質、導入体が分泌する物質、導入体内物質の動態、導入体間接着、導入体の運動、あるいは導入体の寿命等の生命体行動が挙げられる。標的遺伝子の機能が、他の被導入体において既知の場合には、その機能に関連する表現型について解析することが好ましい。表現型の変化を解析する手段としては、導入体の形態の変化を解析する場合には、顕微鏡、あるいは肉眼的に検出する方法を用いることができる。また、導入体内の物質として、例えば mRNA の場合には、その量の解析方法として、ノーザンハイブリダイゼーション、定量的リバーstransフェレースPCR、あるいは In situ hybridization 等が挙げられる。タンパク質の場合には、その量の解析方法として、標的遺伝子がコードするタンパク質を抗原とする抗体によるウェスタンブロッティング法や、標的遺伝子がコードするタンパク質が有する酵素活性を測定する方法等が挙げられる。このようにして解析した、導入体にのみ現れる表現型の変化は、標的遺伝子の発現阻害の

結果生じているものであるので、これを標的遺伝子の機能として同定することができる。

(4) 2本鎖ポリヌクレオチドを用いた標的遺伝子発現阻害により細胞、組織、あるいは個体に特定の性質を付与する方法

本発明の2本鎖ポリヌクレオチドを用いた標的遺伝子の発現阻害により、細胞、組織、あるいは個体に特定の性質を付与することができる。特定の性質とは、標的遺伝子の発現阻害の結果、該導入体に現れるものをさす。ここでの標的遺伝子としては、その発現の阻害が導入体に与える性質がすでに判明しているものでもよいし、機能、もしくは導入体内での機能が未知のものでもよい。機能が未知の標的遺伝子については、これに対する2本鎖ポリヌクレオチドを導入した後に、該導入体が生ずる表現型のうち所望のものを選択することにより、該導入体に所望の性質を付与することができる。

被導入体に付与すべき所望の性質として、具体的には、例えば、細胞内生産機能、細胞外分泌を阻害する機能、細胞やDNAに対する障害の修復機能、特定の疾患に対する耐性機能等が挙げられる。具体的には、被導入体が植物個体等の場合、標的遺伝子としては、果実熟成に関連する酵素、植物構造タンパク質、若しくは病原性に関連する遺伝子等が挙げられる。

標的遺伝子の発現阻害が、特定の疾患に対する耐性機能を有する場合としては、特定のタンパク質の発現の上昇が特定の疾患の原因となる場合で、標的遺伝子は、上記タンパク質をコードする遺伝子や、上記タンパク質の発現を制御する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子等が挙げられる。具体的例としては、標的遺伝子が癌化／腫瘍化表現型の保持に必要である遺伝子であり、被導入体が癌性細胞、または腫瘍組織等である。

このような標的遺伝子に対する2本鎖ポリヌクレオチドは、標的遺伝子がコードするタンパク質の発現を阻害することから、標的遺伝子が関連する疾患の治療または予防薬として用いることができる。2本鎖ポリヌクレオチドを上記薬剤の有効成分として用いる場合には、該ポリヌクレオチドを単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いること

もできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1～90重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口投与、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口投与を挙げることができる。また、その投与量は、症状、年齢、体重等によって適宜選択することができる。

このような遺伝子を標的とする2本鎖ポリヌクレオチドが導入された導入体は、その遺伝子発現阻害に付随すると予測される表現型によって選択される。また、導入する2本鎖ヌクレオチドにおいて、特定の遺伝標識、例えば蛍光タンパク質等をコードする配列を連結しておけば、被導入体に該2本鎖ポリヌクレオチドと共に導入した蛍光タンパク質の発現阻害度に基づいて選択することも可能である。このうち、例えばガン抑制に機能する遺伝子を標的遺伝子とした場合、選択されるべき細胞の形質としては、増殖能の亢進や、細胞接着能の低下、あるいは運動（転移）能の亢進等、悪性腫瘍の形質等が挙げられる。また、生体リズムを調製する遺伝子を標的遺伝子とした場合、選択されるべき細胞の形質としては、細胞固有の概日リズムの消失等が挙げられる。さらには、環境変異原によるDNA損傷の修復等に関与する遺伝子を標的遺伝子とした場合、選択されるべき細胞の形質としては、変異原に対して感受性を示すこと等が挙げられる。

選択された導入体は、それぞれに適したそれ自体既知のクローン化技術により系として樹立、取得することができる。具体的には、被導入体が細胞である場合には、導入体は通常の培養細胞における細胞株樹立法である、限界希釈法、薬剤耐性マーカーによる方法等により細胞株として樹立、取得することができる。本発明で取得された特定の機能を付与された導入体は、有用物質の産生あるいは分泌効率が上昇した細胞株、細胞あるいはDNA等に対する障害を与える環境要因に対して高感受性を示す細胞株、疾病に付随する形質を示し、疾病治療のモデルとして使用することができる。

このうち、疾病治療のモデルとなる細胞株の取得方法を、本発明のさらなる具体的な適用例として説明する。標的遺伝子としては、その発現量の低下、または欠如が疾病の原因となる遺伝子が挙げられる。具体的には、アルツハイマー病に

における PS 1 遺伝子、色素性乾皮症の XPA/XPD/XPF/XPG 遺伝子や DNA polymerase η 遺伝子、大腸ガンの APC 遺伝子、乳ガンの BRCA 1/BRCA 2 遺伝子、糖尿病の INS/INSR 遺伝子等が挙げられる。

これらのヒト遺伝子等の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドを、例えばヒト由来の培養細胞に導入することにより、ヒト型の疾病モデル細胞を取得することができる。

さらにこの特定の性質を付与された細胞、組織、あるいは個体に被検物質を接触させて、その遺伝子が関与する疾病の症状、あるいは形質に変化が現れるか否かを解析することによれば、上記疾病の治療剤、及び/または予防剤のスクリーニングを行うことも可能である。

このようなスクリーニングにより選択された物質を上記薬剤の有効成分として用いる場合には、該物質を単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1～90重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口投与、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口投与を挙げることができる。また、その投与量は、症状、年齢、体重等によって適宜選択することができる。

(5) インディケーター遺伝子の発現阻害度を指標とした一次選択を用いる方法
本発明の上記(1)～(4)に記載した方法は、被導入体に標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入する方法であるが、本発明の方法では、さらに (a) インディケータータンパク質をコードする DNA を含む発現ベクター、(b) 該インディケータータンパク質をコードする塩基配列の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入し、該インディケータータンパク質から発せられる信号量を指標として導入体を一次スクリーニングすることにより、導入体内での遺伝子の発現阻害がかかった導入体のみを解析することができ、効率的な解析を行うことができる。

本発明のさらに具体的な例として、被導入体を脊椎動物由来の培養細胞とし、インディケータータンパク質を蛍光タンパク質とした場合を説明する。脊椎動物由来の培養細胞に蛍光タンパク質をコードする DNA を含む発現ベクターを導入して培養し、該インディケータータンパク質から発せられる蛍光量が、特定の強さ以上の細胞を選択する。ここで選択された細胞に、さらにインディケータータンパク質をコードする DNA の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入して培養して、インディケーター遺伝子の発現の阻害度を、該インディケータータンパク質から発せられる蛍光量の減弱度により解析する。

このような一次スクリーニングは、いずれも被導入体への 2 本鎖ポリヌクレオチドの導入が行われたことや、該導入体内で標的遺伝子の発現阻害が起こっていることを確認するものであるので、インディケータータンパク質は、そのタンパク質量とそれが発する信号量とが相関するものである必要がある。このようなタンパク質の具体例としては、ルシフェラーゼタンパク質が挙げられる。

さらには、標的遺伝子発現の阻害度を測定する場合に、インディケータータンパク質の発現量を基準として、標的遺伝子がコードするタンパク質量を算出することもできる。

(6) 本発明に用いられるキット

上記 (1) ~ (5) に記載した方法を行うためのキットとしては、2 本鎖ポリヌクレオチド、インディケータータンパク質をコードする DNA を含むベクター、インディケーター遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチド、酵素、バッファー等の試薬類、ポリヌクレオチド導入のための試薬類等が含まれる。本発明のキットは、これら全ての試薬類等を含む必要はなく、上記した本発明の方法に用いられるキットであればいかなる試薬類等の組み合わせであってもよい。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発

明についての具体的認識を得るための一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1 CHO-KI細胞内に導入した2本鎖DNA-RNAハイブリッドによる標的遺伝子の発現阻害

(1) DNA-RNA ハイブリッド型2本鎖ポリヌクレオチドの作成

標的遺伝子としてはホタル (*Photinus pyralis*) の luciferase 遺伝子 (*P. pyralis* luc 遺伝子 : accession number : U47296) を用い、これを含む発現ベクターとしては pGL3-Control ベクター (Promega 社製) を用いた。*P. pyralis* luc 遺伝子断片はこのベクター中で SV40 のプロモーターとポリ A シグナルで挟まれた形になっている。またインディケーター遺伝子はウミシイタケ (*Renilla reniformis*) の luciferase 遺伝子を用い、これを含む発現ベクターとして pRL-TK (Promega 社製) を用いた。

本実施例に用いた2本鎖ポリヌクレオチドの作製に使われた、21ヌクレオチドからなるセンス鎖は配列番号1 (DNA) または配列番号2 (RNA) で示すものである。また、アンチセンス鎖は、配列番号3 (DNA) または配列番号4 (RNA) に示すものである。これらの配列について、DNA あるいは RNA のキメラ型1本鎖ポリヌクレオチドを図1に示すとおりに作製した。これらのポリヌクレオチドは日立計測器サービス株式会社を通じてジェンセット株式会社に合成を委託した。センス鎖ポリヌクレオチドの配列は、標的遺伝子である pGL3-Control ベクター中の *P.pyralis* luc 遺伝子 (全長1,653塩基対) の38-58番目のヌクレオチドに相当する。

P.pyralis luc 遺伝子の発現を阻害するために用いた2本鎖RNA、2本鎖DNAならびに2本鎖DNA-RNAハイブリッドは、図1に示したセンス鎖 FLs1 (RNA) または DFLs1 (DNA) と、アンチセンス鎖 FLa2 (RNA) または DFLa2 (DNA) とを会合させることで作製した。会合は、センス1本鎖ポリヌクレオチド、アンチセンス1本鎖ポリヌクレオチドを10mM Tris-HCl (pH7.5), 20mM NaCl 反応液中で90℃、2分間加熱し、更に37℃、1時間インキュベートし、その後室温になるまで放置することで行った。これによりセンス鎖とアンチセンス鎖は会合

し2本鎖ポリヌクレオチドが形成される。2本鎖ポリヌクレオチドの形成は、TBE 緩衝液中での2%アガロースゲルでの電気泳動で検定するが、上記条件では殆どすべての1本鎖ポリヌクレオチドが2本鎖ポリヌクレオチドに会合していた。

(2) 標的遺伝子、インディケーター遺伝子、及び2本鎖ポリヌクレオチドの培養細胞への導入

培養細胞としては CHO-KI 細胞(RIKEN Cell bank)を用い、培地は Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL 社製) に非働化 10% 牛胎児血清 (Mitsubishi Kasei 社製) 及び抗生物質として penicillin (Meiji 社製) 10 units/ml、streptomycin (Meiji 社製) 50 μ g/ml を添加したものをを用い、37℃、5%CO₂存在下で培養した。

この CHO-KI 細胞は 0.3 \times 10⁶ cells/ml の濃度で 24 穴プレートにまき、1 日後に Ca-phosphate 沈殿法 (細胞工学ハンドブック、黒木登志夫ら編、羊土社 (1992)) で 1.0 μ g pGL3- Control DNA、0.5 μ g pRL-TK DNA、及び 0.01、0.1、1、10、100 nM の各 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入した。

(3) 培養細胞内の遺伝子発現の測定

上記実施例 1 (2) で調製した細胞は 20 時間後に回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社製) を用いて、2 種類のルシフェラーゼ (Photinus pyralis luc 及び Renilla reniformis luc) タンパク質の発現量 (ルシフェラーゼ活性) を測定した。蛍光の測定は Lumat LB 9507 luminometer (EG&G Berthold) を用いて行った。

CHO-KI 細胞に導入した遺伝子の発現は、DNA-RNA ハイブリッド型 2 本鎖ポリヌクレオチドによって阻害された (図 2)。値はいずれも、インディケーター遺伝子の発現量 (ルシフェラーゼ酵素活性) に対する標的遺伝子産物の非活性を示す。またこれらは 3 回の実験の平均値を示しており、図中の縦棒は標準偏差を示す。2 本鎖ポリヌクレオチドを導入していない対照群に比べ、2 本鎖 RNA 導入群の場合には 2 本鎖ポリヌクレオチドを 100 nM 添加したとき、96%、セン

ス鎖が DNA でアンチセンス鎖が RNA の 2 本鎖ポリヌクレオチド導入群では 80 % の標的遺伝子発現の阻害が観察された。即ち、2 本鎖ポリヌクレオチドのセンス側が DNA であったとしてもアンチセンス側が RNA であれば、2 本鎖 RNA に比べて効果が弱いながら、CHO-KI 細胞での遺伝子発現を阻害し得ることが証明された。

実施例 2 ショウジョウバエ S 2 細胞内に導入した DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドによる遺伝子の発現阻害

(1) DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドの作製

標的遺伝子としては実施例 1 と同様の *Photinus pyralis* の luciferase 遺伝子 (*P. pyralis* luc 遺伝子 : accession number : U 4 7 2 9 6) を用いた。またインディケーター遺伝子は *Renilla reniformis* の luciferase 遺伝子を用いた。さらに発現ベクターも実施例 1 に記載のものを用いた。

本実施例に用いた 2 本鎖ポリヌクレオチドの作製に使われた、21 ヌクレオチドからなるセンス鎖は配列番号 1 (DNA) または配列番号 2 (RNA) で示すものである。また、アンチセンス鎖は、配列番号 3 (DNA) または配列番号 4 (RNA) に示すものである。これらの配列について、DNA あるいは RNA のキメラ型 1 本鎖ポリヌクレオチドを図 1 に示すとおりに作製した。これらのポリヌクレオチドは日立計測器サービス株式会社を通じてジェンセット株式会社に合成を委託した。

P. pyralis luc 遺伝子の発現を阻害するために用いる DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドは、図 1 に示したセンス鎖 FLs1(1 本鎖 RNA) とアンチセンス鎖 FLa2-1、FLa2-2、FLa2-3、FLa2-4、FLa2-5、FLa2-6、FLa2-7、FLa2-8、FLa2-9、FLa2-10 (DNA-RNA キメラ型 1 本鎖ポリヌクレオチド) とをそれぞれ会合させることで作製した。会合の方法としてはセンス 1 本鎖 RNA、アンチセンス DNA-RNA キメラ型 1 本鎖ポリヌクレオチドを実施例 1 と同様にして反応させた。2 本鎖ポリヌクレオチドの産生は TBE 緩衝液中での 2 % アガロースゲルでの電気泳動で検定した。

(2) 標的遺伝子、インディケーター遺伝子、及び DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポ

リヌクレオチドの培養細胞への導入

培養細胞としてはショウジョウバエ S 2 細胞 (Schneider, I., et al., J. Embryol. Exp. Morph., 27, 353-365(1972)) を用い、培地は Schneider's Drosophila medium (Gibco BRL 社製) に非働化 10% 牛胎児血清 (Mitsubishi Kasei 社製) 及び抗生物質として penicillin (Meiji 社製) 10 units/ml、streptomycin (Meiji 社製) 50 μ g/ml を添加したものを、25℃、5% CO₂ 存在下で培養した。

この S 2 細胞は 1.0×10^6 cells/ml の濃度で 24 穴プレートにまき、1 日後に Ca-phosphate 沈殿法 (細胞工学ハンドブック、黒木登志夫ら編、羊土社 (1992)) で 1.0 μ g pGL-3 Control DNA、0.05 μ g pRL-TK DNA、及び 100 nM の各 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入した。

(3) 培養細胞内の遺伝子発現の測定

上記実施例 2 (2) で調製した細胞は 20 時間後に回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社製) を用いて、2 種類のルシフェラーゼタンパク質の発現量を測定した。蛍光の測定は Lumat LB 9507 luminometer (EG&G Berthold) を用いて行った。

S 2 細胞に導入した遺伝子の発現は、2 本鎖のうちのセンス側を RNA に固定し、アンチセンス側を DNA と RNA のキメラ型ポリヌクレオチドにして作製した 21 ヌクレオチドからなる DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドによって阻害された (図 3)。値はいずれも、インディケーター遺伝子の発現量 (ルシフェラーゼ活性) に対する標的遺伝子産物の比活性として求め、3 回の実験の平均値、及び標準偏差で示した。2 本鎖ポリヌクレオチドの内、アンチセンス側が FLa2、FLa2-2、FLa2-3、FLa2-8、FLa2-9 であるものは、2 本鎖ポリヌクレオチドを導入していない対照群に比べ、それぞれ 96%、92%、94%、91%、96% と、ほぼ同等に強く遺伝子発現を阻害した。アンチセンス側が FLa2-5 であるものは、73% と比較的強い阻害効果を示した。アンチセンス側が FLa2-1、FLa2-4、FLa2-6、FLa2-7、FLa2-10 であるものは、全く阻害効果がないか、あるいは阻害が認められても極めて弱い効果であった。強い効果を示した 2 本鎖ポリヌク

レオチドに共通する特徴の一つは、アンチセンス鎖の配列上、5'末端から13、14番目の2ヌクレオチドがRNA(UA)であることである。一方、効果の弱かった2本鎖ポリヌクレオチドにおいては、いずれもアンチセンス鎖配列上の同2ヌクレオチドがDNA(TA)であった。従って、S2細胞を用いた本実施例においては、この2ヌクレオチドが、強いRNAi効果の発現にとって必要かつ十分の領域であることが示唆される。

本実施例においては、アンチセンス配列上のこの領域を含む部分をRNAとして保存し、その他の部分をDNAに置換した2本鎖ポリヌクレオチドの導入によってもRNAi効果が認められた。本実施例で用いたような方法ならびにその他の手法によって、RNAi効果の発現に必要かつ十分とされる領域を特定あるいは予測し、この領域を含む部分をRNAとして保存し、その他の部分をDNAに置換して作製したそれぞれ21ヌクレオチドからなる2本鎖ポリヌクレオチドは、RNAi効果によって標的遺伝子の発現を阻害できると推測される。

実施例3 ヒト HeLa 細胞、及びヒト HEK293 細胞に導入した DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドによる遺伝子の発現阻害

(1) DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドの作製

標的遺伝子としては実施例1と同様に *P.pyralis luc* 遺伝子を用い、これを含む発現ベクターとしては、pGL3-Control ベクター (Promega 社製) を用いた。またインディケーター遺伝子は *Renilla reniformis* の *luc* 遺伝子を用い、これを含む発現ベクターとして pRL-TK (Promega 社製) を用いた。

本実施例に用いた2本鎖ポリヌクレオチドの作製に使われた、21ヌクレオチドからなるセンス鎖は配列番号1 (DNA) または配列番号2 (RNA) で示すものである。また、アンチセンス鎖は、配列番号3 (DNA) または配列番号4 (RNA) に示すものである。これらの配列について、DNA あるいは RNA のキメラ型1本鎖ポリヌクレオチドを図1に示すとおりに作製した。これらのポリヌクレオチドは日立計測器サービス株式会社を通じてジェンセット株式会社に合成を委託した。センス鎖ポリヌクレオチドの配列は、標的遺伝子である pGL3-Control ベクター中の *P.pyralis luc* 遺伝子 (全長 1,653 塩基対) の 38-58 番目のヌクレオ

チドに相当する。

P.pyralis luc 遺伝子の発現を阻害するために用いた DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドは、図 1 に示したセンス鎖 FLs1-1、FLs1-2(DNA-RNA キメラ型 1 本鎖ポリヌクレオチド)とアンチセンス鎖 Fla2 (1 本鎖 RNA) とをそれぞれ会合させることで作製した。会合の方法としてはセンス DNA-RNA キメラ型 1 本鎖ポリヌクレオチド、アンチセンス 1 本鎖 RNA を実施例 1 と同様にして反応させた。2 本鎖ポリヌクレオチドの産生は TBE 緩衝液中での 2 % アガロースゲルでの電気泳動で検定した。

(2) 標的遺伝子、インディケーター遺伝子、及び DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドの培養細胞への導入

標的遺伝子を発現するための組換え発現ベクターは、上記 (1) に記載の pGL3-Control を用い、インディケーター遺伝子の発現ベクターは、上記 (1) に記載の pRL-TK を用いた。培養細胞としてはヒト HeLa 細胞 (ATCC : CCL-2)、及びヒト HEK293 細胞 (ATCC : CRL-1573) を用い、培地は Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL 社製) に非働化 10 % 牛胎児血清

(Mitsubishi Kasei 社製) 及び抗生物質として penicillin (Meiji 社製) 10 units/ml、streptomycin (Meiji 社製) 50 μ g/ml を添加したものを、37℃、5 % CO₂ 存在下で培養した。

HeLa 細胞、HEK293 細胞はそれぞれ 0.5 $\times 10^6$ cells/ml、0.25 $\times 10^6$ cells/ml の濃度で 24 穴プレートにまき、1 日後に Ca-phosphate 沈殿法で 1.0 μ g pGL3-Control DNA、1.0 μ g pRL-TK DNA、及び 100 nM の各 DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入した。

(3) 培養細胞内の遺伝子発現の測定

実施例 1 と同様に、上記実施例 3 (2) で調製した細胞は 20 時間後に回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いて、2 種類のルシフェラーゼタンパク質の発現量を測定した。蛍光の測定は Lumat LB9507 luminometer を用いて行った。

HeLa 細胞ならびに HEK293 細胞に導入した遺伝子の発現は、2 本鎖のアンチセンス側を RNA に固定し、センス側を DNA と RNA のキメラポリヌクレオチドにして作製した 21 ヌクレオチドからなる 2 本鎖ポリヌクレオチドによって阻害された (図 4)。値はいずれも、インディケーター遺伝子の発現量 (ルシフェラーゼ酵素活性) に対する標的遺伝産物の比活性として求め、3 回の実験の平均値、及び標準偏差で示した。2 本鎖ポリヌクレオチドの内、センス側が FLS1-2 であるものを導入した群は、2 本鎖ポリヌクレオチドを導入していない対照群に比べ、90% (HeLa 細胞)、95% (HEK293 細胞) と、2 本鎖 RNA (FLS1/FLA2) 導入群と同等の強い阻害効果を示した。FLS1-2 は配列上 5' 側の 12 ヌクレオチドが RNA であり、その他の領域のヌクレオチドが DNA である。従って、HeLa 細胞ならびに HEK293 細胞を用いた本実施例においては、アンチセンス鎖を RNA とした場合、センス側の該 12 ヌクレオチドの全体あるいはその一部が、強い RNAi 効果の発現にとって必要かつ十分の領域であることが示唆される。

実施例 4 ヒト CHO-K1 に導入した DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドによる遺伝子の発現阻害

(1) DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドの作製

標的遺伝子としては実施例 1 と同様に *P.pyralis luc* 遺伝子を用い、これを含む発現ベクターとしては、pGL3-Control ベクター (Promega 社製) を用いた。またインディケーター遺伝子は *Renilla reniformis* の *luc* 遺伝子を用い、これを含む発現ベクターとして pRL-TK (Promega 社製) を用いた。

本実施例に用いた 2 本鎖ポリヌクレオチドの作製に使われた、21 ヌクレオチドからなるセンス鎖ポリヌクレオチドの配列は、標的遺伝子である pGL3-Control ベクター中の *P.pyralis luc* 遺伝子 (全長 1,653 塩基対) の 8-28 番目 (8-28)、38-58 番目 (38-58)、1087-1107 番目 (1087-1107) のポリヌクレオチドに相当する。

それぞれの塩基配列は、8-28 のセンス鎖が配列番号 5 (DNA)、6 (RNA)、アンチセンス鎖が配列番号 7 (DNA)、8 (RNA) に示すものであり、38-58 のセンス鎖が配列番号 1 (DNA)、2 (RNA) で、アンチセンス鎖が配列番号

3 (DNA)、4 (RNA) に示すものである。また 1087-1107 のセンス鎖の塩基配列は配列番号 9 (DNA)、10 (RNA) で、アンチセンス鎖が配列番号 11 (DNA)、12 (RNA) で示すものである。

これらの配列について、上流側の約半分 (10~13ヌクレオチド) がセンス、アンチセンス共に RNA であるもの (C)、上流側の約半分 (10~13ヌクレオチド) がセンス、アンチセンス共に DNA であるもの (D) であるもの、アンチセンスが RNA であり、センス鎖の上流の約半分 (10~13ヌクレオチド) が RNA であるもの (E)、センス鎖が RNA であり、アンチセンス鎖の上流の約半分 (10~13ヌクレオチド) が DNA であるもの (F) を作製した。これらのポリヌクレオチドは日立計測器サービス株式会社を通じてジェンセット株式会社に合成を委託して、キメラ型ポリヌクレオチドとした後にそれぞれ会合させて作製した。会合方法としてはセンス、アンチセンス DNA-RNA キメラ型 1 本鎖ポリヌクレオチドを実施例 1 と同様にして反応させた。2 本鎖ポリヌクレオチドの産生は TBE 緩衝液中での 2 % アガロースゲルでの電気泳動で検定した。

(2) 標的遺伝子、インディケーター遺伝子、及び DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドの培養細胞への導入

標的遺伝子を発現するための組換え発現ベクターは、上記 (1) に記載の pGL3-Control を用い、インディケーター遺伝子の発現ベクターは、上記 (1) に記載の pRL-TK を用いた。培養細胞としてはヒト CHO-K1 細胞 (ATCC: CCL-61) を用い、培地は Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL 社製) に非働化 10 % 牛胎児血清 (Mitsubishi Kasei 社製) 及び抗生物質として penicillin (Meiji 社製) 10 units/ml、streptomycin (Meiji 社製) 50 μ g/ml を添加したものをを用い、37℃、5 % CO₂ 存在下で培養した。

CHO-K1 細胞はそれぞれ 0.3×10^6 cells/ml の濃度で 24 穴プレートにまき、1 日後に Ca-phosphate 沈殿法で 1.0 μ g pRL-TK DNA、10 nM または 100 nM の各 DNA-RNA キメラ型 2 本鎖ポリヌクレオチドを導入した。

(3) 培養細胞内の遺伝子発現の測定

実施例 1 と同様に、上記実施例 4 (2) で調製した細胞は 20 時間後に回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いて、2 種類のルシフェラーゼタンパク質の発現量を測定した。蛍光の測定は Lumat LB 9 5 0 7 luminometer を用いて行った。

2 本鎖ポリヌクレオチドの構造およびコントロール (2 本鎖ポリヌクレオチドを導入していない細胞) のルシフェラーゼ活性に対する該ポリヌクレオチドを導入した細胞のルシフェラーゼ活性を図 5 に示した。図中、白抜き四角は RNA 鎖を示し、黒い四角は DNA 鎖を示す。図から明らかなように、いずれの塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいても、CHO-K1 細胞に導入した遺伝子の発現は、少なくともポリヌクレオチドの上流約半分を RNA としたそれぞれが 21 ヌクレオチドからなる 2 本鎖ポリヌクレオチドによって阻害された (図 5 (A)、(C) および (E))。

本実施例で用いたような方法ならびにその他の手法によって、RNAi 効果の発現に必要なかつ十分とされる領域を特定あるいは予測し、この領域を含む部分を RNA として保存し、その他の部分を DNA に置換して作製したそれぞれが 21 ヌクレオチドからなる 2 本鎖ポリヌクレオチドは、RNAi 効果によって標的遺伝子の発現を阻害できると推測される。

本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

本出願は、2001 年 11 月 21 日出願の日本特許出願 (特願 2001-355896) に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

産業上の利用可能性

本発明によれば、培養細胞、組織、個体において、ヒトならびにその他の生物種の遺伝子が生体内でどのような機能を有するかを直接的に解析する手段が提供される。また、インディケーターを用いる方法によれば、RNAi 効果の発現が弱い細胞であっても、特に RNAi 効果の高く発現している細胞を一次スクリーニン

グすることができるため、効率のよい解析を行うことができる。

同目的に供される従来の発明技術としては、2本鎖 RNA の導入による RNAi 法が挙げられるが、RNA は特に 1 本鎖の状態では RNA 分解酵素によって極めて容易に分解され、かつ製造費用が高額であるという問題点がある。本発明では、導入するポリヌクレオチドが完全に RNA であることを限定しない。従って、DNA と RNA からなるポリヌクレオチド、具体的には DNA 鎖と RNA 鎖からなるハイブリッドポリヌクレオチド、又は DNA-RNA キメラポリヌクレオチドを用いることによって導入するポリヌクレオチドの物質としての安定性を高め、製造費用を低減することが可能である。このことから、本発明によれば、導入するポリヌクレオチド自体を疾患治療を目的とした製剤として開発することができる。また、DNA は RNA と比較して蛍光標識、ビオチン標識、アミン化、リン酸化、チオール化等の修飾をより多種にわたり容易に行うことができる。従って、医薬品あるいは試薬として使用する場合に、このような化学的修飾を行うことによって目的に応じた機能を付加することができる。

請 求 の 範 囲

1. 標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する DNA と RNA からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドを、細胞、組織、あるいは個体に導入することを特徴とする標的遺伝子の発現阻害方法。
2. 2 本鎖ポリヌクレオチドが、自己相補性を有する 1 本鎖からなることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。
3. 2 本鎖ポリヌクレオチドが、DNA 鎖と RNA 鎖のハイブリッドであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。
4. DNA 鎖と RNA 鎖のハイブリッドが、センス鎖が DNA で、アンチセンス鎖が RNA であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。
5. 2 本鎖ポリヌクレオチドが、DNA と RNA のキメラであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。
6. 2 本鎖ポリヌクレオチドが、該ポリヌクレオチドのうち、少なくとも上流側の一部が RNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。
7. 上流側の一部が、9 ～ 13 ヌクレオチドからなることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。
8. 2 本鎖ポリヌクレオチドが、19 ～ 25 ヌクレオチドからなり、該ポリヌクレオチドのうち、少なくとも上流 1 / 2 が RNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。
9. 標的遺伝子が、複数であることを特徴とする請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の方法。
10. 請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の方法による標的遺伝子の発現阻害の結果、該細胞、組織、あるいは個体に現れる表現型の変化を解析することを特徴とする遺伝子の機能解析方法。
11. 請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の方法を用いた標的遺伝子の発現の阻害により、細胞、組織、あるいは個体に特定の性質を付与する方法。
12. 請求項 11 に記載の方法により得られる細胞、組織、あるいは個体。
13. 請求項 12 に記載の細胞、組織、あるいは個体に被検物質を添加し、該

細胞、組織、あるいは個体に付与された性質の変化を解析することを特徴とする、標的遺伝子が関与する疾病の予防、及び／または治療剤のスクリーニング方法。

14. 請求項13に記載の方法により得られた物質を有効成分とする標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び／または治療剤。

15. 請求項13に記載の方法により選抜された物質を製剤化することを特徴とする標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び／または治療剤の製造方法。

16. 請求項1～9のいずれかに記載の方法において、細胞、組織、あるいは個体にさらにインディケータータンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターを導入して、該インディケータータンパク質から発せられる信号量が、特定の強さ以上のものを選択して解析することを特徴とする方法。

17. 請求項1～9のいずれかに記載の方法において、細胞、組織、あるいは個体にさらにインディケータータンパク質をコードするDNAを含む発現ベクター、及び該DNAの少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列からなり、かつDNAを含む2本鎖RNAを細胞に導入して、該インディケータータンパク質から発せられる信号量が減弱した細胞、組織、あるいは個体を選択して解析することを特徴とする方法。

18. インディケータータンパク質が、タンパク質量とそれが発する信号量とが比例して変化していくものである請求項16または17に記載の方法。

19. インディケータータンパク質が、ルシフェラーゼである請求項16～18のいずれかに記載の方法。

20. (i) 標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する2本鎖ポリヌクレオチドであってDNAとRNAのキメラからなるものを作製し、(ii) 該2本鎖ポリヌクレオチドを細胞、組織、あるいは個体に導入し、(iii) 該細胞、組織、あるいは個体中の標的遺伝子の発現阻害度を測定し、(iv) 標的遺伝子の発現阻害にRNAであることが必要とされる配列を特定することを特徴とするRNAi法におけるRNAの機能部位の同定方法。

21. 2本鎖ポリヌクレオチドが、その2本鎖のどちらか一方がRNA鎖であることを特徴とする請求項20に記載の方法。

22. 請求項1～11、13、15～21のいずれかに記載の方法に用いるた

めの２本鎖ポリヌクレオチド。

２３． 少なくとも請求項２２に記載の２本鎖ポリヌクレオチドを含む標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び／または治療剤。

２４． 少なくとも請求項２２に記載の２本鎖ポリヌクレオチドを含む請求項１～１１、１３、１５～２１のいずれかに記載の方法を行うためのキット。

図 1

センス鎖：

FLs1: CAUUCUAUCCGCUGGAAGAUG

DFLs1: CATTCTATCCGCTGGAAGATGFLs1-1: CATTCTATCCGCUGGAAGAUGFLs1-2: CAUUCUAUCCGCTGGAAGATG

アンチセンス鎖：

FLa2: UCUUCCAGCGGAUAGAAUGGC

DFLa2: TCTTCCAGCGGATAGAATGGCFLa2-1: UCUUCCAGCGGATAGAAUGGCFLa2-2: TCTTCCAGCGGAUAGAAATGGCFLa2-3: TCTUCCAGCGGAUAGAAUGGCFLa2-4: UCUTCCAGCGGATAGAAATGGCFLa2-5: TCTTCCAGCGGAUAGAAUGGCFLa2-6: UCUUCCAGCGGATAGAAATGGCFLa2-7: TCTTCCAGCGGATAGAAATGGCFLa2-8: UCUUCCAGCGGAUAGAAUGGCFLa2-9: TCTTCCAGCGGAUAGAAUGGCFLa2-10: UCUUCCAGCGGATAGAAATGGC

図 2

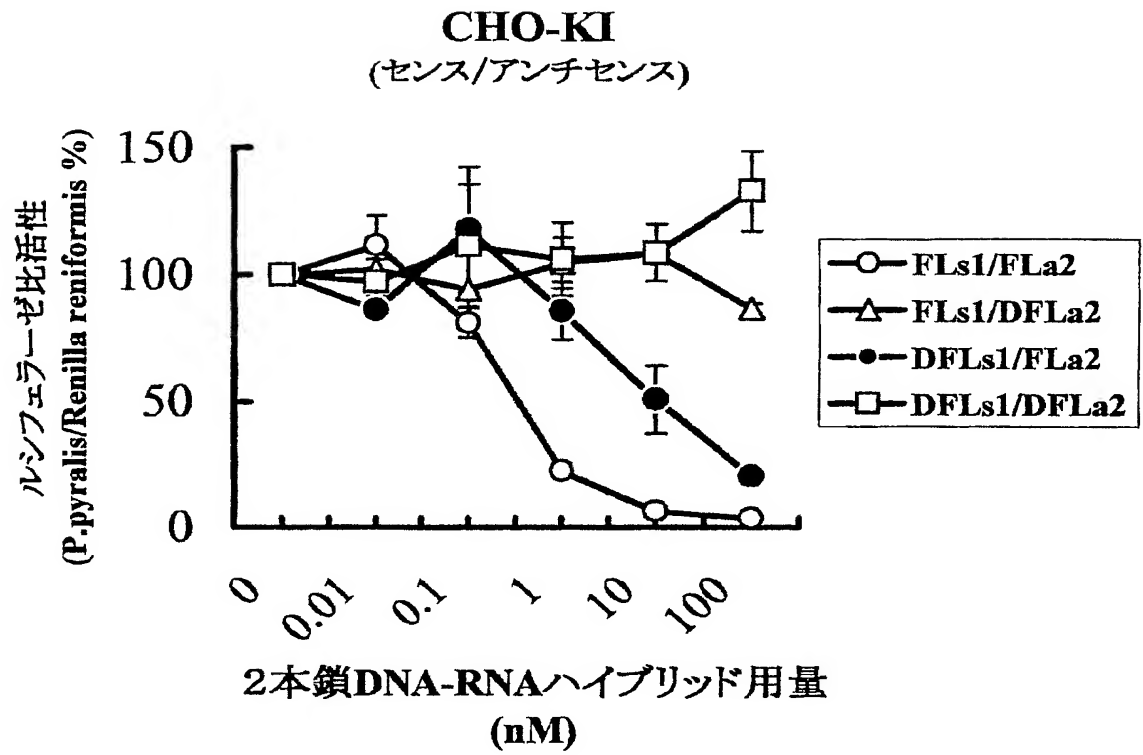


図 3

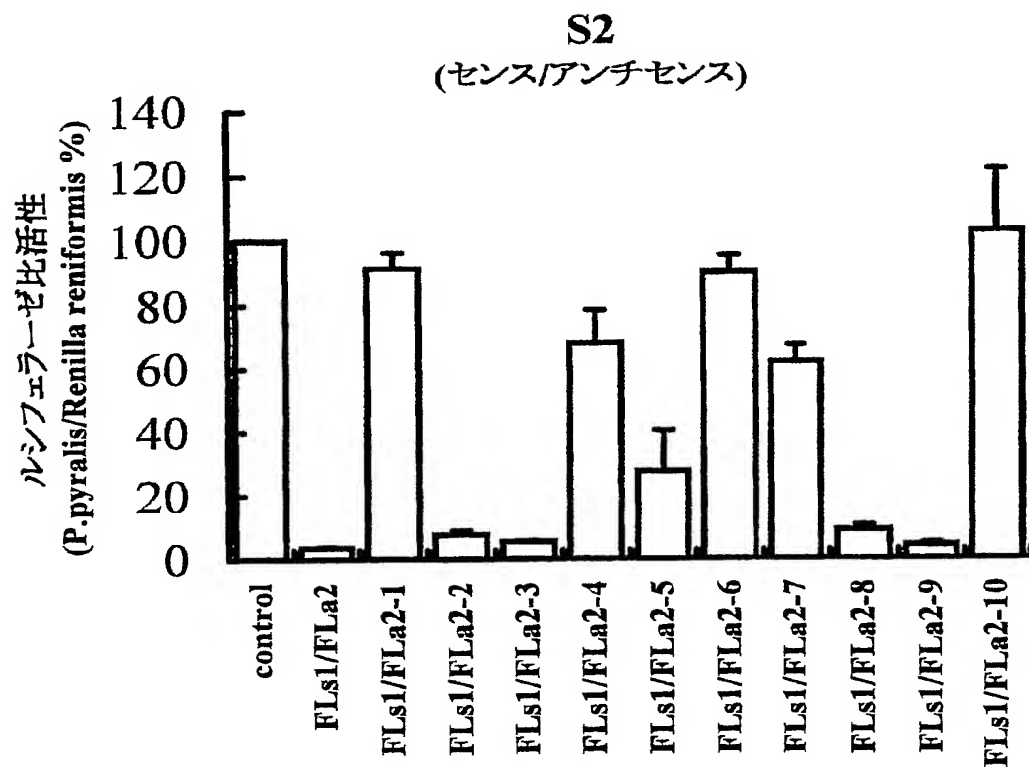


図 4

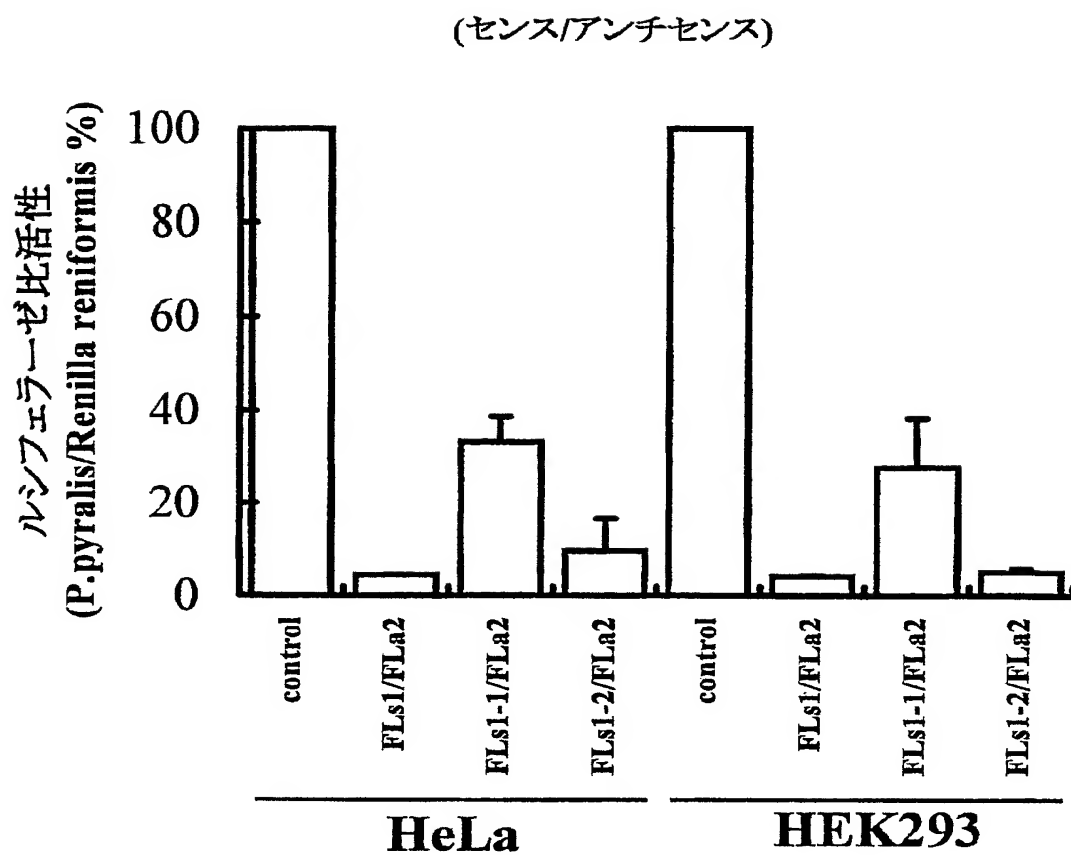
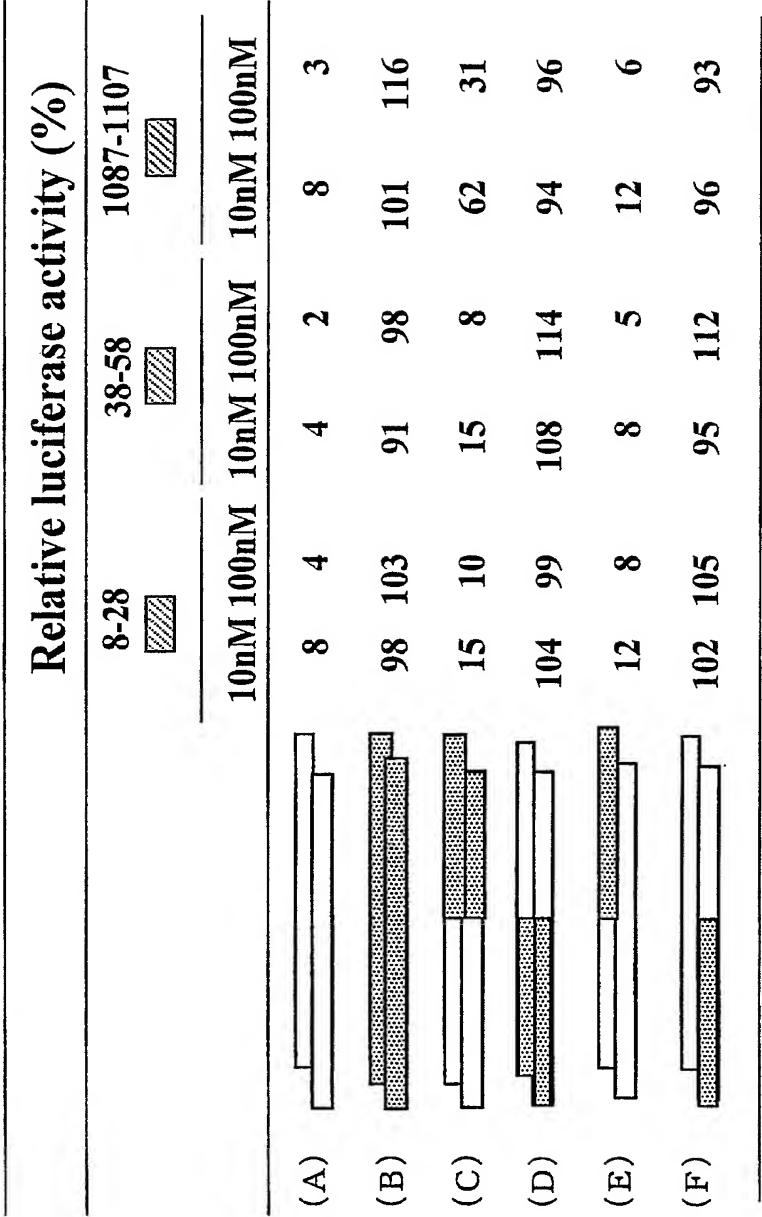


図 5

CHO-K1



SEQUENCE LISTING

<110> MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION

<120> Genetic Inhibition by doublestranded polynucleotide

<130> P-43361

<140> JP 2001-355896

<141> 2001-11-21

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 1

cattctatcc gctggaagat g

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 2

cauucuaucc gcuggaagau g

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 3

tcttcacgac gatagaatgg c

21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 4

ucuccacgac gauagaauagg c

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 5

acgcaaaaaa cataaagaaa g

21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 6

acgccaaaaa cauaaagaaa g

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 7

ttcttttatgt ttttggcgtc t

21

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 8

uucuuuaugu uuuuggcguc u

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 9

ggtaaagttg ttttattttt t

21

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 10

gguaaaguug uuuuauuuuu u

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 11

aaaatggaac aactttaccg a

21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 12

aaaauggaac aacuuuaccg a

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12N5/10, A61K48/00, A61K31/713, G01N33/50,
G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12N5/10, A61K48/00, A61K31/713, G01N33/50,
G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Sayda M. ELBASHIR et al., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. NATURE, May 2001, Vol.411, pages 494 to 498	1, 5, 6, 8-13, 16-20, 22-24
X	Hiroaki TAHARA, "Shinkaku Seibutsu ni okeru RNAi to PTGS", Protein, Nucleic acid and Enzyme, 1 November, 2001 (01.11.01), Vol.46, No.14, pages 2017 to 2024	1, 5, 6, 8-13, 16-20, 22-24
A	Sayda M. ELBASHIR et al., RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. GENES & DEVELOPMENT, January 2001, Vol.15, pages 188 to 200	1-13, 16-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
17 January, 2003 (17.01.03)Date of mailing of the international search report
28 January, 2003 (28.01.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12183

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 14, 15

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the "substance obtained (selected) by the method as set forth in claim 13", it is completely unknown what specific substances are involved in the scope thereof and what are not, even though the common technical (Continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12183

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Alexandra BOUTLA et al., Short 5'-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in <i>Drosophila</i> . <i>Current Biology</i> , 13 November, 2001 (13.11.01), Vol.11, pages 1776 to 1780	1, 3-6, 8-13, 16-20, 22-24
P, X	Hirohiko HOHJOH, RNA interference (RNAi) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells. <i>FEBS Letters</i> , 2002, Vol.521, pages 195 to 199	1-13, 16-24
P, X	WO 02/10374 A2 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA), 07 February, 2002 (07.02.02), & US 2002/137709 A1	1-13, 16-24
P, X	Thijn R. BRUMMELKAMP et al., A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. <i>SCIENCE</i> , April 2002, Vol.296, pages 550 to 553	1, 5, 6, 8-13, 16-20, 22-24
P, X	Jenn-Yah YU et al., RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , April 2002, Vol.99, No.9, pages 6047 to 6052	1, 5, 6, 8-13, 16-20, 22-24
P, X	Takashi MORITA et al., "Ho'nyu Dobutsu no Idenshi Kenkyu ni Katsuyo Sareru RNAi" <i>Protein, Nucleic acid and Enzyme</i> , November 2002, Vol.47, No.14, pages 1939 to 1945	1, 5, 6, 8-13, 16-20, 22-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12183

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

knowledge at the point of the application is considered. Therefore, the above claims are described in an extremely unclear manner.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12N5/10, A61K48/00, A61K31/713,
G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12N5/10, A61K48/00, A61K31/713,
G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Sayda M. ELBASHIR et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. NATURE, May 2001, Vol. 411, p. 494-498	1, 5, 6, 8-13, 16-20, 22-24
X	田原 浩昭, 「真核生物におけるRNAiとPTGS」 蛋白質 核酸 酵素, 2001年11月1日, 第46巻, 第14号, 2017頁-2024頁	1, 5, 6, 8-13, 16-20, 22-24
A	Sayda M. ELBASHIR et al. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. GENES & DEVELOPMENT, January 2001, Vol. 15, p. 188-200	1-13, 16-24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.01.03

国際調査報告の発送日

28.01.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Alexandra BOUTLA et al. Short 5'-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in <i>Drosophila</i> . Current Biology, 13 November 2001, Vol. 11, p. 1776-1780	1, 3-6, 8-13 16-20, 22-24
PX	Hirohiko HOHJOH, RNA interference (RNAi) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells. FEBS Letters, 2002, Vol. 521, p. 195-199	1-13, 16-24
PX	WO 02/10374 A2 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 2002. 02. 07 & US 2002/137709 A1	1-13, 16-24
PX	Thijn R. BRUMMELKAMP et al. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. SCIENCE, April 2002, Vol. 296, p. 550-553	1, 5, 6, 8-13, 16-20, 22-24
PX	Jenn-Yah YU et al. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, April 2002, Vol. 99, No. 9, p. 6047-6052	1, 5, 6, 8-13, 16-20, 22-24
PX	森田 隆 等, 「哺乳動物の遺伝子研究に活用されるRNAi」 蛋白質 核酸 酵素, 11月 2002年, 第47巻, 第14号, 1939頁-1945頁	1, 5, 6, 8-13, 16-20, 22-24

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 14, 15 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
「請求項13に記載の方法により得られた(選抜された)物質」とあるが、出願時の技術常識を勘案しても、具体的にどのような物質が包含され、どのような物質が包含されないのかが全く不明であって、上記請求の範囲の記載は著しく不明確である。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。